

ZÁRÓJELENTÉS

Általános megjegyzések

A T 048713 sz. kutatási pályázat futamideje során az eredeti munkatervhez képest több módosulás / módosítást történt; ezeket túlnyomó részben a külső körülmények előre nem látott – ezért nem tervezhető – megváltozása indukálta. A fontosabb változások az alábbiakban összegezhetők:

Személyi feltételek: Dr Illyés Tünde-Zita (ITZ) 2006. februártól– 2008. szeptemberig szülési-gyermekgondozási szabadságon volt. Dr Kiss László egyetemi docent 2006-ban nyugdíjazták, a diplomázó egyetemi (ill. tervezett PhD) hallgató (Girán Levente, GL) pedig 2005-ben úgy döntött, hogy más témában kívánja szakdolgozatát elkészíteni. ITZ helyettesítésére Szabó Ildikó (SZI) frissen végzett okleveles vegyészt alkalmaztuk 2006. március – 2008. június közötti időszakra.

Költségvetés: az OTKA országos költségvetésének 2005. évi csökkentése miatt jelen pályázat 2005. évi támogatását is csökkentették 10%-kal (259 eFt). 2008-ban a költségterven belüli átcsoportosításra kértem – és kaptam – engedélyt a Műszaki és Természettudományi Kollégiumtól ill. az OTKA Irodától.

Futamidő: kérésemre az illetékes grémium hozzájárult a kutatás befejezési határidejének egy évvel történő meghosszabbításához.

Kutatási tematika: a szintetikus célkitűzések megvalósítása a két junior résztvevő (ITZ és GL) feladata volt a munkaterv szerint (72 ill. 80%-os kutatási idő-ráfordítással). ITZ jelentős szakmai tapasztalatokkal rendelkezett: doktori fokozatát a pályázat benyújtásának évében (2004) szerezte meg a tervezett szintetikus munka közvetlen előzményét képező kutatási témában. A munkaerő- és időigényes szintetikus célkitűzések teljesítésében a hallgatói résztvevő (GL) munkájára hangsúlyosan számítottunk perspektívában is, doktoranduszként. Két kutató kiesését egy, a szénhidrátkémiai háttérrel és tapasztalatokat nélkülöző kezdő vegyész alkalmazása a pályázati ciklus felére értelemszerűen csak kis részben pótol(hat)ta. Emiatt kénytelenek voltunk a kutatási terv szintetikus komponensét redukálni, így nem valósulhattak meg a szialil-Tn és a calicheamicin diszacharidok analógjainak szintézisére tervezett elképzeléseink.

Az NMR metodikai fejlesztések és molekulaszervezeti alkalmazások témakörében ugyanakkor sikerült a kutatási tervben szereplő célkitűzéseken túlmenő eredményeket is elérnünk

első sorban a heteronukleáris csatolások és az STD-NMR módszerek tekintetében. Röntgendiffrakciós, mikrokalorimetriai (ITC) és kiroptikai módszerekkel bővítettük tovább a szerkezetvizsgálati metodikák palettáját. A részleteket a Kutatási eredmények fejezetben taglaljuk.

Eredményeink elérésében nagy szerepet játszottak kutatási együttműködési kapcsolataink hazai és külföldi partnerekkel. Utóbbiak a kutatási munkatervben is szereplő argentin (TÉT) [4,7]* és dél-afrikai (TÉT) [13] kapcsolatokon túl a pályázat futamideje alatt tovább bővültek indiai (TÉT) [11], spanyol (MTA-CSIC) [6] és chilei (támogatás nélkül) [2, 8] partnerekkel.

Összességében 11 szakcikket jelentettünk meg referált, nemzetközi kémiai folyóiratokban. Egy, az Elsevier egyik nagymonográfiájába felkérésre készített összefoglaló cikkünk [14] nyomdában van (megjelenik 2010. márciusban), egy másik publikálásra összeállítva [13] rövidesen beküldésre kerül, és egy harmadik a teljes kísérleti anyag birtokában összeállítás alatt áll (l. Közleményjegyzék ill. Kutatási eredmények). Ez a publikációs teljesítmény lényegesen felülmúlja a munkatervben a teljes futamidőre prognosztizált közlemények számát (4-8). A közlemények anyagának nagy részét hazai és nemzetközi konferenciákon és egyéb fórumokon (Munkabizottságok, Bruckner-termi előadás, Magyar Tudomány Ünnepe, stb.) ismertettük.

Kutatási eredmények

3-Kötéses interglikozidos híd (3KGH) tartalmazó szénhidrát származékok szintézise

Oscar Varela (Buenos Aires) professzor csoportjával együttműködve olyan új típusú diszacharid mimetikumok szintéziséről számolunk be, amelyekben az alegységeket egy háromkötéses tioéter-híd köti össze oly módon, hogy a kapcsolódásban résztvevő egyik pillératom sem anomer szén. Ebből következően ezen származékok másik specifikuma *két* anomer centrum megjelenése egy adott diszacharidban. A szintézisek szénhidrát tioloknak hex-enopiranozid-ulóz származékokra történő Michael addícióján alapulnak. A szintézisek során olyan ortogonális védőcsoport-stratégiát alkalmaztunk, amely lehetővé tette az eredeti anomer konfigurációk részleges megőrzését, és ezáltal az elvileg lehetséges izomerek számának

csökkentését. A tioéter-kötés, ellentétben a természetes (acetál típusú) glikozidos kötéssel, nem hidrolizálható, így e származékok a glikánhidroláz enzimek potenciális inhibitorai [4].

Mono-, bisz (1,2; 1,3 ill. 1,4)- és trisz(1,3,5)-bróm-metil-benzolszármazékokból metántioszulfonáto-metilén származékokat állítottunk elő, amelyek nukleofil szubsztitúciós reakciókban jó hozammal reagáltak α - és β -glikozil-tiolátokkal enyhe körülmények között. Ily módon egy központi aromás maghoz diszulfido-metilén-kötésekkel kapcsolt, D-glüko-, D-galakto- ill. D-manno-konfigurációjú monoszaccharid egységeket tartalmazó oligovalens szénhidrát-származékokat konstruáltunk [11]. Az α -D-manno-sorozat tagjai specifikus kötődnek egy növényi lektin-fehérjéhez, a Concanavalin-A-hoz (l. alább).

Diszulfid típusú di- és oligoszacharidok szintézismódszereinek fejlesztése céljából vizsgáltuk N-diacil-szulfénamidok (N-glikoziltio-szukcinimidek és -ftálimidek) glikozilszulfenil-donor tulajdonságait. Ezen szulfénamid-típusú szulfenil-transzfer reagensek több tekintetben előnyösebbnek bizonyultak az eddig általunk, és mások által is e célra használt származékoknál (általában β -glikozil- alkil- és -ariltioszulfonátok). Egyszerűen, jó hozammal előállítható, gyakran kristályos, stabilis vegyületek, és – a tioszulfonát típusú donoroktól eltérően – α - és β -anomer formában egyaránt hozzáférhetők. Tiolokkal nukleofil szubsztitúciós reakcióban enyhe körülmények között reagálnak, és közepes-jó hozammal szolgáltatják a megfelelő vegyes diszulfid származékokat. Az akceptor tiol típusától függően ezzel az eljárással szitetizáltunk számos Glyc-S-S-Glyc' típusú nem-szimmetrikus diglikozil-diszulfidot (ahol Glyc és Glyc' különböző monoszacharid egységeket jelöl, amelyek 1 \rightarrow 1', 1 \rightarrow 6', vagy 1 \rightarrow 4' pozíciókban kapcsolódnak diszulfid-kötésen keresztül). Az oldalláncban tiol-csoportot tartalmazó ciszteinből és glutationból hasonló módon Glyc-S-S-Pept (ahol Pept aminosav/peptid) típusú vegyes diszulfidokat állítottunk elő. Ez utóbbi reakció fehérjék kontrollált glikozilezése útján nyerhető neoglikoproteinek szintézisére nyújt újabb lehetőséget. [Szabó Tamás: Új glikozil-szulfénamidok előállítása és reakcióik vizsgálata. Vegyész diplomamunka, Debrecen, 2009. Témavezető: Tóthné dr. Illyés Tünde Zita. Közlemény összeállítása folyamatban].

Új NMR módszerek kidolgozása és alkalmazása:

Új 2D NMR módszert fejlesztettünk ki többkötéses proton-szén (proton-nitrogén, proton-foszfor, proton-szelén, stb.) skaláris spin-spin csatolási állandók meghatározására. A javasolt

CPMG-HSQMBC kísérlet eredményeként tisztán abszorpciós fázisú multipletteket kapunk, melyek alapján a csatolások mérése a korábbiaknál lényegesen pontosabban és megbízhatóbban valósítható meg. A nem kívánt ^1H - ^1H csatolási evolúciót – mely a multiplettek torzulását eredményezi – proton-szén (illetve ^1H -X) CPMG-szekvencia alkalmazásával oldottuk meg. A CPMG-szekvencia optimalizálásával – összetett (composite) ^1H és ^{13}C (X) 180° -os impulzusok valamint rövid (kb. 120-150 μs) impulzusok közti várakozási idő alkalmazásával – további jelentős javulást értünk el. A módszer alkalmazhatóságát és előnyeit különböző szénhidrát származékok proton-szén csatolási állandóinak meghatározásával igazoltuk. A heteronukleáris csatolási állandók mérése összetett proton-multiplettek esetén is megbízható volt. [3]

Érzékeny, ^1H -detektáláson alapuló INADEQUATE kísérleteket (IPAP-DEPT-INADEQUATE és RINEPT-INADEQUATE) javasoltunk a több-kötésű ^{13}C - ^{13}C csatolási állandók pontos és megbízható mérésére. A módszer alkalmazhatóságát számos mono- és diszacharid példáján bizonyítottuk, megmérve azok összes lehetséges távolható ^{13}C - ^{13}C csatolási állandóit. A kapott ^{13}C - ^{13}C multiplettek számítógépes elemzésével 2 Hz-nél kisebb csatolási állandók is mérhetők. Korszerű, nagyérzékenyséűű hűtött mérőfejek (cryoprobe) alkalmazásával a módszer lehetőséget nyújt a csatolási állandók meghatározására természetes ^{13}C -izotópgyakoriság ($\sim 1\%$) esetén is. A DEPT-INADEQUATE kísérlet általánosan alkalmazható C, CH és CH_2 atomok/csoportok C-C korrelációinak és csatolási állandóinak meghatározására. Az új kísérletek érzékenysége kb. kétszerese a megfelelő ^{13}C -detektáláson alapuló módszerekének. [9]

Új, csoport-szelektív telítés-átvitel differencia (^{15}N GS-STD) kísérleteket fejlesztettünk ki fehérje-ligandum kölcsönhatások vizsgálatára könnyűvízes közegben ^{15}N -jelzett fehérje alkalmazásával. A ^{15}N -BIRD^{d,X}-impulzusok alkalmazásán alapuló módszerrel a ^{15}N -izotóppal jelölt fehérje valamennyi amid-proton átmenete egyidejűleg és direkt módon telíthető illetve invertálható. A javasolt eljárással szelektív telítés valósítható meg a ligandum és fehérje proton-rezonancia jeleinek teljes átfedése esetén is. A módszer további előnye a kísérlet robusztussága, azaz nem igényli a mérési körülmények és kísérleti paraméterek többnyire időigényes optimalizálását. Tanulmányoztuk a ^{15}N GS-STD kísérlet alkalmazhatóságát fehérje-peptid valamint fehérje-szénhidrát komplex rendszereken. A módszer nemcsak a kölcsönható partnerek jelátfedési problémájára nyújt megoldást, hanem a 'közvetlen' (direkt) telítés révén a telítés-átvitel hatékonyságát is növeli, és ezáltal jelentős érzékenység-növekedést eredményez. További

előny, hogy a fehérjének azon flexibilis kötő-régiói is hatékonyan telíthetők, amelyeknél a spin-diffúzió alapuló telítés a régió mozgékonyasága miatt nem hatékony. [6]

α/β D-glükopiranoz-származékokon tanulmányoztuk az OH-csoportok konformációját valamint intramolekuláris H-kötés kialakítására való hajlamát. Gradiens TOCSY, HETLOC és HECADE spektrumok tisztán abszorpciós fázisú multiplettjeinek elemzésével meghatároztuk az OH-csoportok összes háromkötéses proton-proton és proton-szén csatolási állandóját. A mért $^3J_{H,OH}$ és $^3J_{C,OH}$ adatokból kiszámítottuk az OH-rotamer-populációkat, valamint meghatároztuk a $^3J_{C(i-1)OH(i)}$ csatolásra vonatkozó - az irodalomban eddig még nem leírt - Karplus paramétereket. A kapott paraméterek kis mértékben eltérnek az interglikozidos $^3J_{C,H}$ csatolásra Tvaroska és mtsai. által megadott értékektől. Az OH-konformer-populációkat és rotáció-átlagolt csatolási állandókat kvantumkémiai számításokkal is meghatároztuk; a kísérleti és a számított adatok jó egyezést mutattak. [12]

Hasonló rotamer-populáció analízist elvégeztünk az általunk korábban szintetizált nem-szimmetrikus diglikozil-diszulfid származékokra is. A konformációs viszonyok teljesebb felderítésére – különös tekintettel az -S-S- kötés körüli torziós szögekre – a ROESY/NOESY mérésekből kapott proton-proton távolságokat molekuladinamikai (MD) számításokkal vetettük össze. Az MD szimuláció (10 ns, CHARMM33b, CSFF erőter, explicit DMSO-„doboz”) statisztikai elemzésével (ART2’ adaptív analóg mintázat-felismerés) nyert konformer családokra számított NMR-paraméterek jól egyeztek a kísérleti értékekkel. Az interglikozidos torziós szögek értékei hasonlóak voltak a szilárd fázisban mértékhez (l. alább), az OH-csoportok intramolekuláris H-kötésre kevésbé hajlamosak, az oldószer-molekulákhoz (DMSO) kapcsolódó H-kötés viszont minden esetben kimutatható volt. [13, Kézirat közlésre előkészítve].

Ketózkodnál, mint pl. az élő szervezetekben kulcsfontosságú N-acetil-neuraminsav esetében, az anomer konfiguráció NMR módszerrel történő meghatározása általában a (kvaterner) anomer C $^3J_{CH}$ csatolásán alapul. Számos szintetizált ketopiranozil-glikozid és ismert szerkezetű modellvegyületen történő mérés, valamint az irodalmi adatok kritikai értékelésére alapozva kimutattuk, hogy ez a módszer csak kellő körültekintéssel alkalmazható, mivel a szubsztituens-effektusok jelentős mértékben befolyásolják a vonatkozó, általában kicsi ($^3J_{CH} \sim 1-2$ Hz) csatolási állandókat [5]

Röntgendiffrakciós és kiroptikai szerkezetvizsgálatok

Egy korábban általunk leírt diglikozil-diszulfid [$\text{Glc}\beta(1\rightarrow1)\text{Galp}$ oktaacetát], valamint egy diglikozil-tioszulfínát származék röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatával megállapítottuk, hogy a C1-S-S-C1' interglikozidos torziós szög az oldatfázisban korábban valószínűsített értékhez hasonló (ca. -90°). A tioszulfínát-származékban a trivalens kén konfigurációja (S)_s, a megfelelő torziós szög pedig ca. 170° -ra nő a kén oxidációs fokának változásával [2]. A $\text{Glc}\beta(1\rightarrow1)\text{Galp}$ oktaacetát THF szolvátja egy másik kristályformában azonos szerkezeti paraméterekkel bír [8].

Általunk korábban szintetizált diglikozil-dikalkogenidek (Glyc-S-S-Glyc' , Glyc-S-S-Glyc ill. Glyc-Se-Se-Glyc , ahol Glyc és Glyc' különböző monoszaccharidokat jelöl) kiroptikai vizsgálatával (CD mérések, ill. elméleti számítások) megállapítottuk, hogy mind szilárd-, mind oldatfázisban az M helicitású dikalkogenid-kötéssel jellemzett izomerek dominálnak [10].

Szénhidrát – fehérje kölcsönhatások

A szintetikus részben említett oligo-diszulfido-metilén-glikozil benzolszármazékok közül az α -D-manno konfigurációjú oligovalens származékok közepes erősséggel (K_d ca. 0.1mM tartományban, ITC mérésekből) kötődnek a Concanavalin-A lektinhez. A termodinamikai paramétereken (entalpia, entrópia) túl a komplexek sztöchiometriáját is meghatároztuk. Utóbbi olyan oligomerek kialakulására utal amelyekben a fehérjemolekulákat a ligandumok kapcsolják össze keresztkötésekkel. A ligandumok specifikusan a lektin szénhidrát-kötőhelyéhez kapcsolódnak: ezt a tényt STD-NMR kompetíciós kísérletekkel bizonyítottuk [11].

Egyéb

Felkérésre két összefoglaló cikket készítettünk a pályázathoz kapcsolódó témakörben. Az egyik tioglikozidok és nem-konvencionális, 3-kötéses interglikozidos hidat ($3KGH$) tartalmazó szénhidrát származékok szintézisével és szerkezetével foglalkozó legújabb irodalmat tekinti át [4], a másikban szénhidrát-származékok NMR szerkezetvizsgálatának témakörében 468 szakcikk eredményeit összegeztük; ez a közlemény az Elsevier egyik nagymonográfiájában jelenik meg rövidesen [14].

* A weboldalon a „ZÁRÓJELENTÉS Közlemények” rovatban megadott sorszám.